动 物 学 研 究 2008，Jun. 29(3)：265—269 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI:10.3724/SP.J.1141.2008.03265

维生素 E 对 2,3,7,8-四氯二苯并二噁英急性染毒小鼠卵巢内分泌及其结构的影响

尹海萍[#]，徐建平[#]，周显青[*]

（首都医科大学 基础医学院实验动物学系，北京 100069）

摘要：为研究维生素 E 对 2，3，7，8－四氯二苯并二噁英（TCDD）染毒小鼠生殖内分泌功能和卵巢的影响，设计了急性染毒实验。将 24 只 4－5 周龄的健康雌性小鼠（*Mus musculus*）随机分为对照组、TCDD(30 μg/kg)染毒组和染毒同时给予 100 mg/kg 维生素 E 组 3 组。通过放射免疫法测定小鼠血浆孕酮、雌二醇含量的变化，显微镜下计数卵泡数量并观察其形态变化。结果表明，TCDD 能导致小鼠血浆孕酮含量的降低及卵巢结构的紊乱、卵泡数量的减少。100 mg/kg 的维生素 E 能明显对抗急性 TCDD 染毒引起的雌鼠孕酮含量和卵泡数量降低，缓解 TCDD 引起的小鼠卵巢形态结构的病变；TCDD 染毒和维生素 E 对小鼠血浆雌二醇含量均没有明显影响。结果表明，维生素 E 对 TCDD 引起的内分泌功能紊乱以及卵泡数量降低有拮抗作用。

关键词：TCDD；维生素 E；生殖；内分泌
中图分类号：Q492; Q355 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2008)03-0265-05

Effects of Vitamin E on Reproduction Endocrine and Ovary Structures in Mice Acutely Treated with TCDD

YIN Hai-ping[#]，XU Jian-ping[#]，ZHOU Xian-qing[*]

(*Department of Laboratory Animal Science, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing* 100069, *China*)

Abstract: The study was conducted to investigate the effects of vitamin E (VE) on reproduction endocrine and ovary structures in mice acutely treated with TCDD. Twenty-four mice were divided into control groups, TCDD-treated with 30 ug/kg group, and a TCDD-treated with 30 μg/kg followed with 100 mg/kg vitamin E group. The level of progesterone and estradiol of plasma were analyzed by radio-immunity methods. The number of ova and the ovary forms were counted and observed under the microscope. The results showed that TCDD obviously decreased the level of plasma progesterone and the number of ova, changed the forms of ovaries, while 100 mg/kg VE significantly alleviated these effects caused by TCDD. TCDD and VE had no significant effects on the levels of plasma estradiol. The results indicated that VE had anti-actions on the endocritic function and a decrease in the progesterone level and the ova number in mice, caused by TCDD.

Key words: TCDD; Vitamin E; Reproduction; Endocrine

2,3,7,8－四氯二苯并二噁英（TCDD）是近年来逐渐被认识的一类持久性有机污染物，主要是由于人类的生产和生活活动而释放到环境中去的，具有多方面的毒性作用。它不仅能降低大鼠(*Rattus norvegicus*)血清中睾酮水平、延缓精子的发育和成熟、降低受精能力(Lachoumycandane et al，2002a)，而且能破坏其睾丸中线粒体和微粒体的抗氧化防御系统，造成氧化应激(Lachoumycandane et al，2002b)；引发其子代雄性出现不育及雌性化等(Mabley et al，1992a)，导致孕鼠出现死胎或胚胎发育迟缓、腭裂、肾盂积水等（Cordier et al，2004)；引起妊娠猕猴流产、受孕率下降、子宫重量减轻、子宫内膜异位甚至不孕（Guo et al，2000)；降低鱼类生育能力(Heiden et al，2006)。在对人类的研究

收稿日期：2007-12-24； 接受日期：2008-05-06
基金项目：国家自然科学基金资助(30470278)
[*]通讯作者(Corresponding author)，Tel：010-83911313，E-mail: xianqingzhou@yahoo.com.cn
[#]对本文有同等贡献。作者简介：尹海萍，女，硕士研究生；徐建平，女， 博士研究生

中发现，母亲暴露于 TCDD，可导致其女儿月经异常，以及经期雌二醇和促卵泡激素的升高（Yang et al，2005）。小鼠（*Mus musculus*）暴露于 TCDD 下，会引发和人类女性子宫内膜症相似的反应（Tultul et al，2007）。

由于 TCDD 可导致动物体和人体生殖内分泌系统严重的毒性作用，因此如何防止或缓解 TCDD 引起的毒性影响，已成为目前急待解决的问题。然而，目前这方面研究较少。Hassoun et al（1997）的研究表明，维生素 E 琥珀酸酯和鞣酸可以对抗 TCDD 引起的小鼠氧化应激，降低其诱导的小鼠胚胎发育迟缓、胎鼠死亡和胎盘重量下降。Lachoumycandane et al（2002c）研究发现，每天给予 20 mg/kg 的维生素 E，能缓解 TCDD 诱导的雄性大鼠睾丸、附睾、精囊和前列腺重量的减轻、精子生成数量的减少，缓解其体内抗氧化酶活性的降低和过氧化氢水平的升高。从现有的研究报道来看，目前关于 TCDD 的研究多集中在其毒性和机理上，而对如何防止和减轻其毒性作用的研究极少。而关于维生素 E 对 TCDD 染毒雌性小鼠生殖功能的影响，目前国内外均未见报道。鉴于此，我们拟探讨维生素 E 对 TCDD 染毒雌性小鼠生殖及内分泌功能的影响，以期通过维生素 E 的添加，缓解 TCDD 对其造成的毒性影响，揭示维生素 E 与 TCDD 之间的关系。

1　材料和方法

1.1　实验动物和饲养驯化

实验用 ICR 小鼠(*Mus musculus*)购自北京维通利华实验动物技术有限公司。每只小鼠单独饲养于 26 cm×15 cm×15 cm 的鼠笼内。室温控制在（22±2）℃，湿度为（50±5）%，40W 日光灯采光，每天的光照周期为 12L∶12D。小鼠自由饮水和进食。小鼠饲料为北京科澳协力有限公司生产，其营养成分为：粗蛋白 20.6%，脂肪 4.16%，碳水化合物 53.17%，粗纤维 4.92%，灰分 7.5%，水分 9.65%。在此条件下驯养 1 周，使其适应实验室环境条件后再开始实验。实验所用的 TCDD 纯度为 97%，由中国科学院生态环境研究中心提供；维生素 E 纯度为 95%，为美国 Sigma 公司产品。

1.2　实验设计

将 24 只体重范围为 20.3－28.5 g 的 4－5 周龄的健康雌性小鼠称重，随机分成对照组、TCDD 染毒组和实验组 3 组，每组 8 只，单养。染毒组和实验组均一次性灌胃 TCDD 30 μg/kg 进行染毒；实验组在 TCDD 染毒后的第二天灌胃维生素 E 100 mg/kg，此时对照组和染毒组都灌胃溶剂玉米油，以便给予同样的操作。连续灌胃 3 d 后，眼球采血、处死，取其卵巢和血液，并将血液在 4℃ 3 500 r/min 条件下离心 15 min，分离血浆，放置于－80℃冰箱中冻存、备用。

1.3　实验方法

1.3.1　血浆孕酮和雌二醇的测定　孕酮和雌二醇都采用北京福瑞生物工程公司生产的放射免疫试剂盒进行测定。分别按它们各自试剂盒的要求进行加样操作，最后离心，吸去上清液，用 FJ-2008PS 型 γ-计数仪测定各管沉淀的放射性计数，计算、定量。

1.3.2　固定和包埋　将卵巢切块后用福尔马林固定 12－24 h，经过 70％→80%→90%→95％→100％不同浓度的酒精中脱水，每一步骤约 4 h 左右，入二甲苯脱酒精两次，每次约 20 min，浸蜡后，用石蜡包埋。

1.3.3　切片制作　将包埋块托固定在切片机上，将组织切成相连成带的切片，取下适当长的切片，放入 37℃水浴箱内，在温水面上展平。在涂抹蛋白甘油的载玻片上贴片后，放入温箱（62℃）内烤干备用。

1.3.4　HE 染色与计数　切片采取 HE 染色 (Wang et al，2004)，染色后在显微镜下计数卵巢切片的卵泡数，并观察其形态。

1.4　数据处理

采用 SPSS11.5 统计软件包对所得数据进行统计分析，用 *t* 检验比较对照组与染毒组以及染毒组与实验组间的差异。结果均以平均值±标准误表示，以 $P<0.05$ 作为差异显著性水准。

2　实验结果

2.1　血浆孕酮、雌二醇含量及卵泡数量的变化

血浆孕酮、雌二醇含量及卵泡数量的变化见图 1。*t* 检验表明，TCDD 染毒组雌鼠血浆孕酮含量明显低于对照组（$P<0.05$），维生素 E 对 TCDD 急性染毒雌鼠血浆孕酮含量有显著影响($P<0.05$)，实验组雌鼠血浆孕酮含量显著高于 TCDD 染毒组（$P<0.05$）(图 1A)； TCDD 对雌鼠血浆雌二醇含量无显著影响（$P>0.05$）；维生素 E 对 TCDD 急性

染毒雌鼠血浆雌二醇含量显著影响（$P>0.05$），TCDD 染毒同时给予维生素 E 100 mg/kg 时，雌鼠血浆雌二醇含量无明显变化（$P>0.05$）（图 1B）；TCDD 染毒组雌鼠卵泡数量显著低于对照组（$P<0.05$）；维生素 E 对 TCDD 急性染毒雌鼠卵泡数量有显著影响，TCDD 染毒同时给予维生素 E 100 mg/kg 时，其卵泡数量明显高于 TCDD 染毒组($P<0.05$) （图 1C）。

2.2　小鼠卵巢结构的变化

小鼠卵巢结构的变化见图 2，显微镜下切片观察发现，对照组卵巢结构完整，层次分明(图 2A)，卵泡结构正常（图 2B）；TCDD 染毒组卵巢体积明显缩小(图 2C)，卵泡结构紊乱（图 2D）；实验组卵巢结构完整(图 2E)，卵泡组织结构清楚，形态正常（图 2F）。

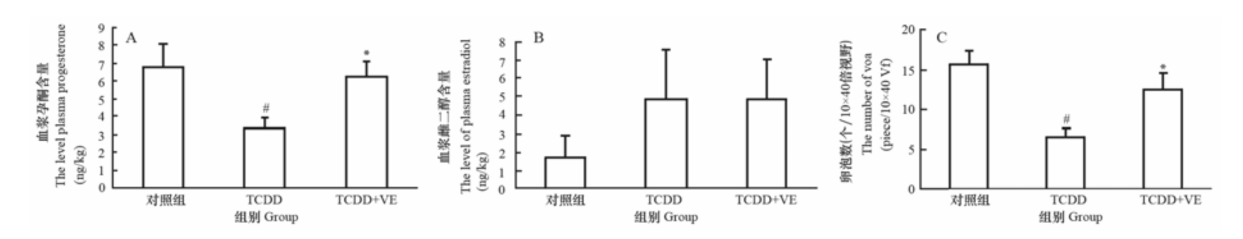


图 1　VE 对 TCDD 急性染毒雌鼠血浆孕酮含量（A）、雌二醇含量（B）及卵泡数量（C）的影响

Fig. 1　The effect of VE on the level of plasma progesterone (A), estradiol (B) and the number of ovarian follicles (C) in female mice treated with TCDD (M±*SE*)

#代表对照组与染毒组差异显著（The value with # represents significant different between control groups and TCDD groups），$P<0.05$；

*代表染毒组与实验组差异显著（The value with * represents significant different between TCDD group and VE group），$P<0.05$。

3　讨　论

3.1　维生素 E 对 TCDD 染毒雌性小鼠生殖内分泌的影响

本研究表明，一次性使用 30 μg/kgTCDD 染毒，能明显抑制雌鼠血浆孕酮含量，而对血浆雌二醇的含量无明显影响。这说明，大剂量 TCDD 急性暴露能扰乱小鼠的生殖内分泌功能。维生素 E 在机体生殖内分泌中具有重要作用。维生素 E 的缺乏，能引起雌性大鼠性周期异常和习惯性流产(Azzi et al，2000)，而维生素 E 的添加，能提高小鼠的妊娠率（Awad et al，1994）。我们的工作表明，维生素 E 能逆转 TCDD 染毒引起的小鼠血浆孕酮含量的下降。这说明，维生素 E 对 TCDD 引起的生殖内分泌紊乱有缓解作用。

Li et al（2006）的工作表明，小鼠胚胎早期 TCDD 的浓度达到 2 ng/kg 时，可降低其血清黄体酮的水平，而对雌二醇水平没有影响。一次性 TCDD 染毒 48 小时后，可导致大鼠雌二醇和孕酮分泌量明显增加，而 96 小时后，其雌二醇和孕酮分泌均减少（Mably et al，1992b；Hamm et al，2001）。Salisbury et al(2002)发现，TCDD 能引起雌性大鼠性周期紊乱，导致其血清中雌激素含量显著下降。体外实验发现，TCDD 不仅能降低卵泡黄体酮及雌二醇的表达（Sari et al，2006），而且还能双向调节卵泡颗粒细胞及卵泡膜细胞性激素的分泌（Yao et al，2003；Mably et al，1992b；Hamm et al，2001）。这些研究结果表明，TCDD 能扰乱机体的生殖内分泌系统，而且其扰乱程度与 TCDD 的剂量和作用时间有关。目前认为，TCDD 可能是通过与体内芳香烃受体（AhR）结合，激活了其靶基因的转录过程，诱导肝细胞内细胞色素 P450 酶 1A1 等基因的表达（Pocar et al，2004），改变了细胞色素 P450 酶 1A1 和 1B1 表达的比例，使体内某些代谢酶活力升高，导致雌二醇羟化代谢增加或使雌激素受体下调，进而改变雌二醇的代谢，从而导致血中雌激素水平的下降（Awad et al，1994；Verma et al，2001）。此外，TCDD 诱导的一些酶的表达，参与了体内生物氧化反应，产生过量的活性氧；同时，机体内抗氧化系统受到抑制，使其清除活性氧的能力减弱，从而引起氧化应激反应（Zhang et al，2000），可能也抑制了生殖内分泌细胞的分泌。

关于维生素 E 对 TCDD 引发的机体内分泌功能紊乱的影响，迄今未见报道，没有数据可供比较。维生素 E 拮抗 TCDD 引起的生殖内分泌毒性，可能是通过以下两条途径：（1）通过抑制 TCDD 引起的芳香烃受体（AhR）的活化，抑制了 TCDD 诱导的 CYP450 酶及类固醇脱氢酶的转录与表达，从而拮

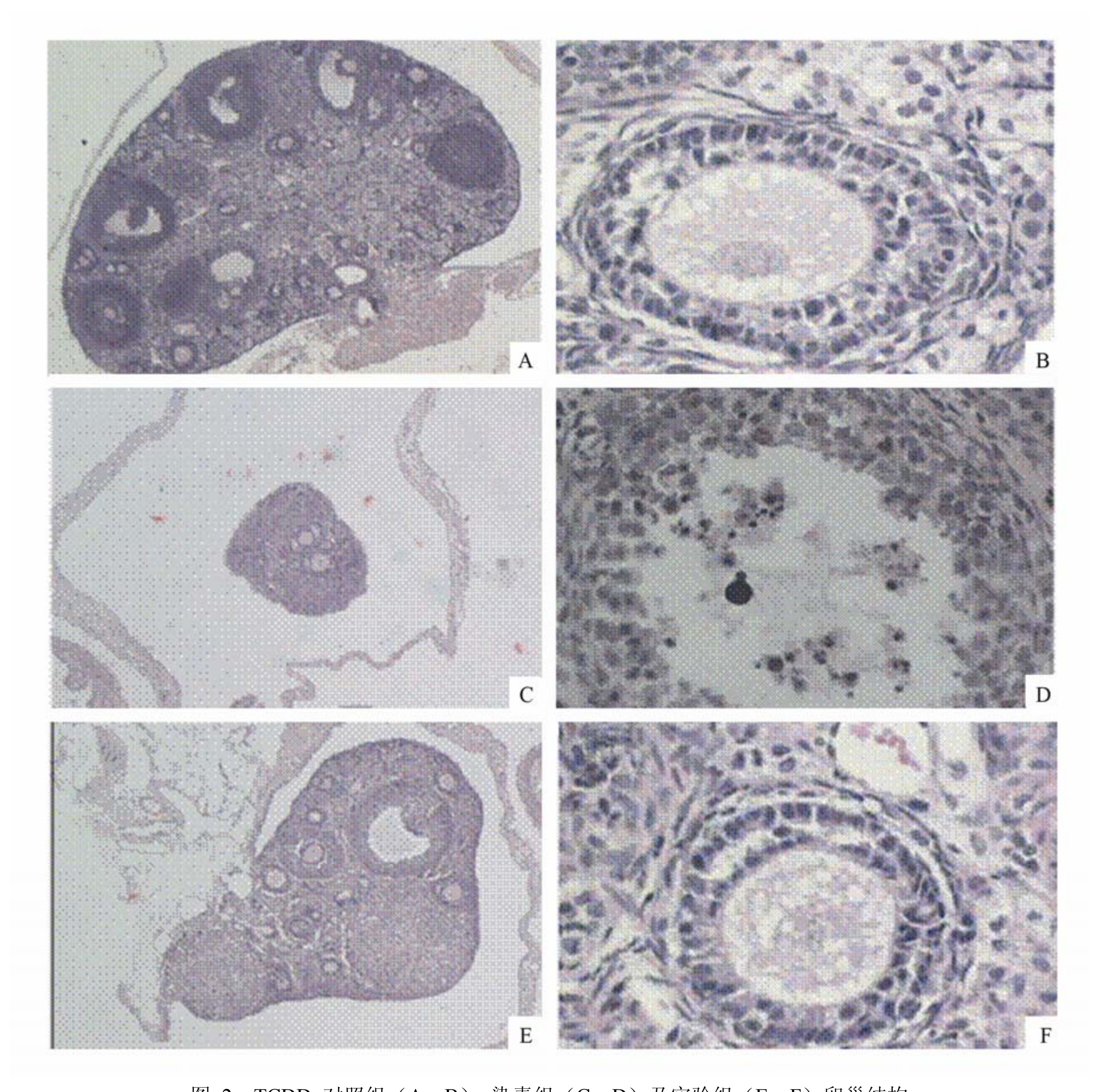


图 2 TCDD 对照组（A，B）、染毒组（C，D）及实验组（E，F）卵巢结构

Fig. 2 The ovarian structure of control group (A, B), TCDD treated group (C, D), and TCDD and VE treated group (E, F)

A，C，E：卵巢结构，HE 染色 10×10；B，D，F：卵泡结构，HE 染色 10×40。

A，C，E：Ovarian structure, HE staining 10×10；B，D，F：Ovarian follicle, HE staining 10×40.

抗了 TCDD 的作用。Palaniappan et al（2007）的工作表明，维生素 E 能缓解由 TCDD 引起的大鼠 CYP450 酶系、3β-羟基固醇脱氢酶和 17β-羟基固醇脱氢酶 mRNA 水平的升高。（2）通过缓解 TCDD 引起的氧化应激而发挥作用。维生素 E 能对抗 TCDD 诱导的雄性大鼠体内抗氧化酶活性的降低和过氧化氢水平的升高（Lachoumycandane et al，2002c）；逆转氟引起的小鼠睾丸组织中丙二醛（MDA）含量的升高（Tengerdy et al，1984）；缓解黄曲霉毒素引发小鼠的脂质过氧化反应（Verma et al，2001）。

3.2 维生素 E 对 TCDD 染毒雌性小鼠卵泡数量及形态的影响

本研究表明，一次性使用 30 μg/kgTCDD 染毒，能够显著降低小鼠卵巢的卵泡数量，抑制卵巢发育，造成卵巢结构紊乱。Salisbury et al（2002)的工作表明，TCDD 能引起雌性大鼠排卵前期的卵泡明显减少；导致卵巢重量减轻和卵细胞数量减少，

并且呈现剂量依赖关系(Gao et al，1999)。这与我们的研究结果类似。这可能是由于 TCDD 诱导了卵巢层粒细胞的 CYP450 酶 1B1 基因的表达，而该基因的表达产物参与了机体内的生物氧化反应，造成的氧化应激影响了卵母细胞的质量、数量和黄体的功能（Vidal et al，2005）。此外，由本实验的结果可以推断，TCDD 可能也通过对性激素分泌的抑制，影响了卵泡的产生和卵巢的发育。

我们的结果表明，100 mg/kg 维生素 E 能够拮抗 TCDD 引起的卵泡数量的减少以及卵巢结构的紊乱。（Hamm et al，2001）。维生素 E 对 TCDD 引起的生殖细胞的减少以及生殖器官结构紊乱的缓解作用，可能是由于维生素 E 通过拮抗 TCDD 对性激素分泌的抑制作用而缓解了 TCDD 的毒性。此外，维生素 E 可能通过抑制 TCDD 引发的氧化应激而发挥作用。

综上所述，TCDD 能够引起小鼠性激素分泌的紊乱、卵巢卵泡数量的下降和形态结构的变化；而维生素 E 对其引发的毒性具有拮抗作用。

参考文献：

Azzi A, Stocker A. 2000. Vitamin E: nonantioxidant roles [J]. *Prog Lipid Res*, **39**(3): 231-255.

Awad JA, Morrow JD, Hill KE. 1994. Detection and localization of lipid peroxidation in selenium and vitamin E deficient rats using F2 isoprostanes [J]. *J Nutr*, **124**(6): 810-816.

Li B, Liu HY, Dai LJ, Lu JC, Yang ZM, Huang L. 2006. The early embryo loss caused by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin may be related to the accumulation of this compound in the uterus[J]. *Reprod Toxicol*, **21**: 301-306.

Cordier S, Chevrier C, Robert Gnansia E. 2004. Risk of congenital anomalies in the vicinity of municipal solid waste incinerators [J]. *Occupational & Environmental Medicine*, **61**(1): 8-15.

Gao X, Son DS, Terranova PF. 1999 .Toxic equivalency factors of polychlorinated dibenzo-2-p-2-dioxins in an ovulation model : valida tion of the toxic equivalency concept for one aspect of endocrine disruption[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, **157**(1) : 107.

Guo YM, Wang MX, Wang XR. 2000. The effects of TCDD on macaque gestational period and pregnancy outcome [J]. *China Public Health*, **16**(11): 1001-1002.[郭玉梅, 王沐沂, 王心如. 2000. TCDD 对猕猴妊娠期及其妊娠结局的毒性影响. 中国公共卫生, **16**(11): 1001-1002.]

Hamm J, Linda S. 2001. Disposition of polychlorinated dibenzopdioxins, dibenzofurans, and nonortho polychlorinated biphenyls in pregnant long evans rats and the transfer to offspring [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **173**(1): 65-88.

Hassoun EA, Walter AC, Alsharif NZ. 1997. Modulation ofTCDD-induce fetotoxicity and oxidative stress in embryonic andplacental tissues of C57BL/6J mice by vitamin E succinate and ellagicacid [J]. *Toxicology*, **124**(1): 27-37.

Heiden TK, Carvan MJ, Hutz RJ. 2006. Inhibition of follicular development, vitellogenesis, and serum 17[beta]-Estradiol concentrations in zebrafish following chronic, sublethal dietary exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin [J]. *Toxicological Sciences*, **90**(2): 490-499.

Lachoumycandane C, Chitra KC, Mathur PP. 2002a. Induction of oxidative stress in rat epididymal sperm after exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin [J]. *Arch Toxical*, **76**(2): 113-118.

Lachoumycandane C, Chitra KC, Mathur PP. 2002b. The effect of 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the antioxidant system in microsomal fractions of rat testis [J]. *Toxicol*, **171**(2-3): 127-135.

Lachoumycandane C, Mathur PP. 2002c. Effects of vitamin E on reactive oxygen species-mediated 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin toxicity in rat testis[J]. *Appl Toxicol*, **22**(5): 345-351.

Mably TA, Bjerke DL, Moore RW. 1992a. In uterol and lactational exposure of male rats to2,3,7,8,-tetrach-lorodibenzo-p-dioxin: Effect on spermatogenesis and reproductive capability [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, **114**: 118-124.

Mably TA, Moore RW, Peterson RE. 1992b. In uteri and lactation exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Effects on androgenic status [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, **114**(1): 97.

Pocar, Paola, Augustin. 2004. Constitutive Expression of CYP1A1 in bovine cumulus oocyte-complexes *in vitro*: Mechanisms and biological implications [J]. *Endocrinology*, **145**(4): 1594-1601.

Palaniappan M,Thirupathi M, Karundevi B, Jagadeesan. 2007. Effects of vitamins C and E on steroidogenic enzymes mRNA expression in polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) exposed adult rat Leydig cells [J]. *Toxicology*, **232**(3)：170-182.

Salisbury TB, Marcinkiewicz JL. 2002. In uteri and lactation exposure to 2,3,7,8-tetradibebzo-p-dioxin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran reducesdisrupts reproductive parameters in female rats [J]. *Biol Reprod*, **66**(6): 1621-1626.

Sari AP, Tapio EH, Matti V, Jorma T, Jorma P. 2006. Effects of in utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on rat follicular steroidogenesis[J]. *Reproductive Toxicology*, **22**(3): 521-528.

Tultul N, Kaylon L, Bruner T, Dagmara PU, Kevin G, Osteen. 2007. Developmental exposure of mice to TCDD elicits a similar uterine phenotype in adult animals as observed in women with endometriosis [J]. *Reproductive Toxicology*, **23**(3): 326-336.

Tengerdy AE, Heinzerling RH, Brown GL. 1984. Enhancement of humoral immune response by vitaminE [J]. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, **44**: 221-226.

Verma RJ, Nair A. 2001. Vitamin E ameliorates aflatoxin-induced biochemical changes in the testis of mice[J]. *Asian J Androl*, **3**(4): 305-309.

Vidal JD, VandeVoort CA, Marcus CB, Lazarewicz NR, Conley AJ. 2005. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces CYP1B1 expression in human luteinized granulosa cells [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **439**(1): 53-60.

Wang MG, Song ZZ. 2004. The handling specification of HE staining slicing[J]. *The Journal of Datong Medical School*, **24**(2): 21-25.[王满贵, 宋志宙. 2004. HE 染色切片的技术操作规范. 大同医学专科学校学报, **24**(2): 21-25.]

Yang CY, Yu ML, Guo HR, Lai TJ, Hsu CC, George L, Yueliang，Guo L. 2005. The endocrine and reproductive function of the female Yucheng adolescents prenatally exposed to PCBs/PCDFs [J]. *Chemosphere*，**61**(3): 355-360.

Yao T. 2003. Physiology[M]. Beijing: People’s Medical Publishing House, 379-383. [姚 泰. 2003. 生理学. 北京：人民卫生出版社，379-383.]

Zhang ZR, Xue SQ. 2000. Molecule mechanism of Dioxin[J]. *Environment and Health*, **17**(5): 316-318. [张志仁, 徐顺清. 2000. 二恶英类化合物质毒性的分子机理. 环境与健康杂志, **17**(5): 316-318.